

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 novembre 2000 (06.11.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00754	Référence du dossier du déposant ou du mandataire H52437 C2/MD
Date du dépôt international (jour/mois/année) 24 mars 2000 (24.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 26 mars 1999 (26.03.99)
Déposant RAOULT, Didier etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

18 septembre 2000 (18.09.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé R. Forax
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DOMANGE, Maxime
Cabinet Beau de Loménie
232, avenue du Prado
F-13295 Marseille cedex 8
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 octobre 2001 (01.10.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire H52437 C2/MD	
Demande internationale no PCT/FR00/00754	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 24 mars 2000 (24.03.00)	

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse LA SCOLLA, Bernard Chemin de Saint Marc 5, Lotissement Négrel F-13790 Rousset FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse LA SCOLA, Bernard Chemin de Saint Marc 5, Lotissement Négrel F-13790 Rousset FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:
Correction du nom.

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Ellen MOYSE no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) H52437 C2/MD

Box No. I TITLE OF INVENTION

DIAGNOSIS OF WHIPPLE'S DISEASE

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (Aix-Marseille II)
Jardin du Pharo

58 Boulevard Charles Livon
13284 MARSEILLE cedex 07

FRANCE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant
for the purposes of:

☐

all designated
States

☒

all designated States except the
United States of America

☐

the United States
of America only

☐

the States indicated in the
Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RAOULT Didier
16 rue de Lorraine
13008 MARSEILLE
FRANCE

This person is:

☐

applicant only

☒

applicant and inventor

☐

inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for
the purposes of:

☐

all designated
States

☐

all designated States except
the United States of America

☒

the United States
of America only

☐

the States indicated in the
Supplemental Box

☒

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DOMANGE Maxime
C/O CABINET BEAU DE LOMENIE
232 Avenue du Prado
13295 MARSEILLE cedex 8
FRANCE

Telephone No.

33.4.91.76.55.30

Facsimile No.

33.4.91.77.97.09

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LA SCOLLA Bernard
Chemin de Saint Marc
5 Lotissement Negrel
13790 ROUSSET

FRANCE

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIRG Marie-Laure
La Grangette
Chemin des Oliviers
Les Arnauds
13400 MARSEILLE

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

FENOLLAR Florence
Le Magellan
352 Avenue du Prado
13008 MARSEILLE

FRANCE

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a): **(Double-click here if you want all the boxes below checked.)****Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*.....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):*

- | | | |
|--|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| | <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> BZ Belize | Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> CO Colombia | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> DZ Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America .. |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | Republic of Macedonia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 21 May 1999	99/06679	FRANCE		
item (2) 26 March 1999	99/03989	FRANCE		
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☐ all items
 ☒ item (1)
 ☒ item (2)
 ☐ item (3)
 ☐ item (4)
 ☐ item (5)
 ☐ other, see Supplemental Box

*Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /

Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)
21 May 1999

Number
FA 572699

Country (or regional Office)
FRANCE

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

		Number of declarations
<input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)	Declaration as to the identify of the inventor	:
<input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
<input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
<input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
<input type="checkbox"/> Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty:	:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) the following number of sheets in paper form:

request (including declaration sheets)

: 4

description (excluding sequence listing part)

: 25

claims

: 4

abstract

: 1

drawings

: 4

Sub-total number of sheets :sequence listing part of description (*actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below*)

: 2

Total number of sheets : 40

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form

(i) ☐ only (under Section 801(a)(i))(ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))**Type and number of carriers** (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (*additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column*):This international application is **accompanied by** the following item(s) (*mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item*):

Number of items

1. ☒ fee calculation sheet2. ☒ original separate power of attorney3. ☐ original general power of attorney4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:5. ☐ statement explaining lack of signature6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):7. ☐ translation of international application into (language):8. ☒ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material9. ☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)(ii) ☐ (*only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column*) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column10. ☐ other (*specify*)**Figure of the drawings** which should accompany the abstract:**Language of filing of the**

international application: FRANCE

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE*Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).*

Maxime DOMANGE

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:

3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):

5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /

6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

2. Drawings:

☐ received:☐ not received:

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire H52437 C2/MD	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00754	Date du dépôt international(jour/mois/année) 24/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 26/03/1999
Déposant UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (AIX-MARSEILLE II)		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrége**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrége est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00754

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 C12N1/00 C12R1/01 C07K16/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	RELMAN D.A. ET AL.: "Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 327, 1992, pages 293-301, XP002123741 cité dans la demande ---	1
X	DRANCOURT M.: "Tropheryma Whippelii, pathogene emergent a culture intracelulaire responsable de la maladie de Whipple" PRESSE MEDICALE, vol. 28, no. 8, 27 février 1999 (1999-02-27), pages 435-439, XP002123742 le document en entier --- -/--	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SCHOEDON G. ET AL.: "Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of <i>Tropheryma whippelii</i> " JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 176, no. 3, 1997, pages 672-677, XP002123743 cité dans la demande abrégé	1,2
X	--- ZAAIJER H.L. ET AL.: "De ziekte van Whipple" NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 143, no. 8, 20 février 1999 (1999-02-20), pages 388-392, XP002123744 abrégé	1
X,P	--- MULLER C. ET AL.: "Cultivation of <i>T. Whippelii</i> from peripheral blood mononuclear cells" GASTROENTEROLOGY, vol. 116, no. 4 part 2, - avril 1999 (1999-04) page A910 XP002123745 abrégé	1
X,P	--- RAOULT D. ET AL.: "Cultivation of the bacillus of Whipple's disease" THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 342, no. 9, 2 mars 2000 (2000-03-02), pages 620-625, XP000913986 cité dans la demande le document en entier	1-26
A,P	--- KIM B-J ET AL.: "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (<i>rpoB</i>)" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 6, juin 1999 (1999-06), pages 1714-1720, XP000913990	21-26
A,P	--- HINRIKSON H.P.: "Detection of three different types of ' <i>Tropheryma Whippelii</i> ' directly from clinical specimens by sequencing single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and type specific PCR of their 16S-23S ribosomal intergenic spacer region" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 49, octobre 1999 (1999-10), pages 1701-1706, XP000914233 --- -/--	21-26

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>MOLLET C. ET AL.: "rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 26, no. 5, 1997, pages 1005-1011, XP000913977</p> <p>abrégé alinéas '0004!-'0006! figure 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	21-26
Y	<p>VON HERBAY A. ET AL.: "DIAGNOSTIC APPLICATION OF A POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR THE WHIPPLE'S DISEASE BACTERIUM TO INTESTINAL BIOPSIES"</p> <p>GASTROENTEROLOGY, vol. 110, 1996, pages 1735-1743, XP000913982</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	21-26

09/936921
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H52437 C2/MD	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00754	International filing date (day/month/year) 24 March 2000 (24.03.00)	Priority date (day/month/year) 26 March 1999 (26.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/00		
Applicant UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (AIX-MARSEILLE II)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.**RECEIVED**

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

AUG 11 2003

TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 18 September 2000 (18.09.00)	Date of completion of this report 16 July 2001 (16.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00754

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-25, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-24, filed with the letter of 26 June 2001 (26.06.2001)
- ☒ the drawings:
 pages 1/4-4/4, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00754

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15, 18-24	YES
	Claims	16, 17	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15, 18-24	YES
	Claims	16, 17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: SCHOEDON G. ET AL., JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 176, no. 3, 1997, pages 672-677

D2: DRANCOURT M., PRESSE MEDICALE, vol. 28, no. 8, 27 February 1999, pages 435-439

D3: ZAAIJER H.L. ET AL., NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 143, no. 8, 20 February 1999, pages 388-392

D4: VON HERBAY A. ET AL., GASTROENTEROLOGY, vol. 110, 1996, pages 1735-1743

D5: MOLLET C. ET AL., MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 26, no. 5, 1997, pages 1005-1011

D6: RAOULT D. ET AL., THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 342, no. 9, 2 March 2000, pages 620-625

D7: HINRIKSON H.P. ET AL., INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 49, October 1999,

pages 1701-1706.

2. Industrial applicability (PCT Article 33(4)):

The content of Claims 1-24 is industrially applicable.

3. Novelty (PCT Article 33(2)):

3.1 Although it appears to describe a method of culturing *Tropheryma whippelii*, document D1 cannot be considered to anticipate the subject matter of Claim 1 of the present application.

Indeed, the subsequent documents D7 (see page 1701, summary, 2nd line; page 1705, 1st column, discussion) and D6 (see page 620, 2nd column, 2nd paragraph) both indicate that, despite the work described in D1, the *T-whippelii* bacterium is not available either in the form of a culture or of an isolate.

The content of Claim 1 is therefore considered to be novel over the available prior art. Consequently, Claims 2-3 are also novel over the cited documents.

None of the cited documents explicitly describes a *T-whippelii* antigen, a specific antibody against *T. whippelii* or a method for detecting an antibody against *T. whippelii*.

Claims 4-15 therefore appear to be novel over the cited documents.

3.2 Claims 16 and 17 are not novel.

The claims relate to a kit (i.e. a product) and cannot therefore refer back to Claims 13-15, that are directed to methods (PCT Guidelines, Section IV, Chapter III-3.8).

It should furthermore be noted that any independent claim should clearly and unambiguously identify all the technical features required to carry out the invention (PCT Guidelines, Section IV, Chapter III-4.4). If the introductory part of Claim 16 was intended to indicate that the methods of Claims 13-15 could be carried out using the claimed kit, this should have been clearly specified in said claim (i.e. by identifying those components that the kit must necessarily contain).

In the present case, the use of the term "or" clearly indicates that the kit may contain each of the components mentioned on its own.

Claim 16 therefore also concerns a kit that may contain exclusively "a solution containing one or more antibodies specific for a human immunoglobulin that recognises said bacterium as per Claims 1-3".

Claim 17 specifies that said antibody is optionally labelled.

Such a kit is therefore not novel, since labelled antibodies against human immunoglobulin (e.g. anti-human Ig rabbit, anti-human Ig mouse) have been commercially available for many years.

Claims 16-17 are therefore not novel.

3.3 In the light of the documents cited in the search report, the nucleotide sequences SEQ ID n° 3, 4 and 5 appear to be novel, as do the sequences specific for at least 12 nucleotide motifs included in said sequences.

Claims 18-24 therefore meet the criterion of novelty.

4. Inventive step (PCT Article 33(3)):

Since the *T. whippelii* bacterium was not available in an isolated and reproducible form, an inventive step can be recognised for Claims 1-15 and 18-24.

The overall problem solved by the present application in relation to the prior art can be considered to be that of isolating the *T. whippelii* bacterium in a reproducible form. This has been achieved in the examples of the present application and has led to the filing of the bacterium at the CNCM (National collection of micro-organism cultures).

This solution cannot be derived in an obvious manner from any of the cited documents, since the applicants were the first to isolate successfully the bacterium.

Therefore, using the isolated bacterium to provide antibodies, antigens, specific nucleotide sequences and associated diagnostic methods is also considered to be inventive.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00754

5. Miscellaneous:

The present examination is based on the assumption that all the claims enjoy right of priority as of the date of filing of the priority document. If this were not to be the case, the P documents cited in the international search report might become relevant.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00754

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in document D7 has not been indicated in the description, nor has this document been cited.

1. The first part of the document is a list of names and dates, which appears to be a record of some kind. The names are written in a cursive script, and the dates are in a more formal, printed style. The list is organized into two columns, with names on the left and dates on the right.

2. The second part of the document is a short paragraph of text, which appears to be a description or explanation of the list. It is written in a cursive script, and is located below the list.

09/93 6921

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 18 JUL 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

157



Référence du dossier du déposant ou du mandataire H 52 437 C2	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00754	Date du dépôt international (jour/mois/année) 24/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 26/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N1/00		
Déposant UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE ... et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 4 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 18/09/2000	Date d'achèvement du présent rapport 16.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Renggli, J N° de téléphone +49 89 2399 7461 

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00754

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-24 reçue(s) avec télécopie du 26/06/2001

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-2, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00754

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-15,18-24 Non : Revendications 16,17
Activité inventive	Oui : Revendications 1-15,18-24 Non : Revendications 16,17
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

Section V:

1 Il est fait référence aux documents suivants:

D1: SCHOEDON G. ET AL., JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 176, no. 3, 1997, pages 672-677

D2: DRANCOURT M., PRESSE MEDICALE, vol. 28, no. 8, 27 février 1999, pages 435-439

D3: ZAAIJER H.L. ET AL., NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 143, no. 8, 20 février 1999, pages 388-392

D4: VON HERBAY A. ET AL., GASTROENTEROLOGY, vol. 110, 1996, pages 1735-1743

D5: MOLLET C. ET AL., MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 26, no. 5, 1997, pages 1005-1011

D6: RAOULT D. ET AL., THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 342, no. 9, 2 mars 2000, pages 620-625

D7: HINRIKSON H.P. ET AL., INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 49, octobre 1999, pages 1701-1706

2 Application industrielle (Art. 33(4) PCT):

Le contenu des revendications 1-24 est susceptible d'application industrielle.

3 Nouveauté (Art. 33(2) PCT)

- 3.1 Le document D1, bien que semblant décrire l'établissement en culture de *Tropheryma whippelii*, ne peut être considéré comme anticipant l'objet de la revendication 1 de la présente demande.

En effet, les documents postérieurs D7 (voir page 1701, résumé, 2e ligne; page 1705, 1e colonne, discussion) et D6 (voir page 620, 2e colonne, 2e paragraphe) indiquent tous deux qu'aucune culture ou isolats de la bactérie *T. whippelii* ne sont disponibles, ce malgré les travaux décrits dans D1.

Le contenu de la revendication 1 est donc considéré comme nouveau au vu de l'art antérieur à disposition. Il s'ensuit que les revendications 2-3 sont également nouvelles par rapport aux documents cités.

Aucun des documents cités ne décrit explicitement un antigène de *T. whippelii*, un anticorps spécifique dirigé contre *T. whippelii* ou une méthode où un anticorps dirigé contre *T. whippelii* est détecté.

Les revendications 4-15 semblent donc nouvelles par rapport aux documents cités.

- 3.2 Les revendications 16 et 17 ne sont pas nouvelles.

La revendication a pour objet une trousse (i.e. un produit) et ne peut donc pas être une revendication dépendante des revendications 13-15 ayant pour objet des méthodes (Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-3.8).

Il est de plus rappeler que toute revendication indépendante doit identifier de manière claire et non ambiguë toutes les caractéristiques techniques nécessaires à la conduite de l'invention (Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-4.4). Si l'intention de la partie introductive de la revendication 16 avait été d'indiquer que les méthodes des revendications 13-15 pouvaient être effectuées à l'aide de la trousse revendiquée, ce fait aurait dû être clairement refléter dans ladite revendication (i.e. par l'identification des composants contenus dans la trousse de

façon obligatoire).

Dans le cas présent, l'emploi du terme "ou" indique clairement que la trousse peut contenir chacun des composants mentionnés uniquement.

La revendication 16 a donc aussi pour objet une trousse pouvant contenir exclusivement "une solution contenant au moins un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon les revendications 1-3".

La revendication 17 spécifie que ledit anticorps peut être marqué.

Une telle trousse n'est donc pas nouvelle puisque des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués (e.g. lapin anti-Ig humaines, souris anti-Ig humaines,...) peuvent être acquis commercialement depuis de nombreuses années.

Les revendications 16-17 ne répondent donc pas au critère de nouveauté.

- 3.3 Les séquences nucléotidiques SEQ ID n°3, 4 et 5 semblent nouvelles, de même que les séquences spécifiques d'au moins 12 motifs nucléotidiques incluses dans lesdites séquences, ce à la lumière des documents cités dans le rapport de recherche.

Les revendications 18-24 répondent donc au critère de nouveauté.

4 Activité inventive (Art. 33(3) PCT):

Puisque la bactérie *T. whippelii* n'était pas disponible sous forme isolée et reproductible, la présence d'une activité inventive peut être reconnue pour les revendications 1-15 et 18-24.

Le problème global résolu par la présente demande par rapport à l'art antérieur peut être considéré comme l'isolation de la bactérie *T. whippelii* sous une forme reproductible. Ceci a été réalisé dans les exemples de la présente demande et à permis le dépôt de la bactérie au CNCM.

Aucun des documents cités ne peut rendre la solution évidente puisque les demandeurs sont les premiers à avoir isolé avec succès la bactérie.

Il s'ensuit que la mise à disposition, à l'aide de la bactérie isolée, d'anticorps, d'antigènes, de séquences nucléotidiques spécifiques et des méthodes diagnostiques associées est également considérée comme inventive.

5 Divers:

Cet examen est fondé sur l'hypothèse que toutes les revendications jouissent d'un droit de priorité datant du dépôt du document de priorité. S'il s'avérait qu'il n'en était pas ainsi, les documents P cités dans le rapport de recherche internationale pourraient devenir pertinents.

Section VII

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique pertinent exposé dans le document D7 et ne cite pas ce document.

REVENDEICATIONS

1. Bactérie *Tropheryma whippelii* responsable de la maladie de Whipple isolée et établie en culture.
- 5 2. Bactérie selon la revendication 1, obtenue à partir d'une culture de cellules de fibroblaste humain après au moins 2 mois d'incubation dans un milieu de culture à base de MEM.
3. Bactérie selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est déposée à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2202.
4. Antigène d'une bactérie selon l'une des revendications 1 à 3.
- 10 5. Antigène selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine choisie parmi les protéines de poids moléculaire d'environ 35, 50, 60, 100, 200 kD déterminés sur les figures 2 et 3 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique Western Blot.
- 15 6. Anticorps spécifique dressé contre la bactérie ou un antigène de la bactérie selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Anticorps suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal d'origine animale, de préférence une immuno globuline de souris.
8. Anticorps selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal.
- 20 9. Anticorps selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal produit par un hybridome déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le numéro d'enregistrement I-2411.
10. Antigène selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine de 200 kD réagissant avec un anticorps selon la revendication 9.
- 25 11. Utilisation d'une bactérie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un antigène suivant les revendications 4, 5 ou 10 pour le diagnostic in vitro de maladies liées à des infections par la bactérie *Tropheryma whippelii*.

12. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 6 à 9, pour le diagnostic in vitro de la maladie liée à des infections par des bactéries *Tropheryma whippelii*.
13. Méthode pour le diagnostic sérologique in vitro de la maladie de Whipple qui comprend les étapes consistant essentiellement à détecter une réaction immunologique entre un anticorps spécifique de la bactérie suivant l'une des revendications 6 à 9, et un antigène de ladite bactérie selon l'une des revendications 4, 5 et 10.
14. Méthode pour le diagnostic sérologique in vitro selon la maladie de Whipple qui comprend l'étape consistant essentiellement à détecter une réaction immunologique entre un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon l'une des revendications 1 à 3, et une dite immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon les revendications 1 à 5.
15. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 14, qui comprend les étapes suivantes :
- le dépôt dans ou sur un support solide de solution contenant la bactérie telle qu'elle est définie dans les revendications 1 à 3,
 - l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à tester,
 - l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'un anticorps marqué spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie,
 - l'observation d'une période d'incubation,
 - le rinçage du support solide, et
 - la détection de ladite réaction immunologique.
16. Trousse pour la détection in vitro de la maladie de Whipple selon la méthode d'une des revendications 13 à 15 comprenant essentiellement comme composants :
- une solution contenant la bactérie ou un antigène tels que définis dans les revendications 1 à 5 et 10, et/ou,

- une solution contenant au moins un anticorps selon l'une des revendications 6 à 9 et/ou,
 - une solution contenant au moins un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon les revendications 1 à 3.
- 5
17. Trousse suivant la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps spécifique marqué.
18. Fragment du gène *rpoB* de la bactérie *Tropheryma whippelii* selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.
- 10
19. Oligonucléotide comprenant une séquence spécifique du gène *rpoB* de la bactérie *Tropheryma whippelii* selon l'une des revendications 1 à 3, ladite séquence spécifique comprenant au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs inclus dans la séquence SEQ ID n° 3.
- 15
20. Oligonucléotide monocaténaire selon la revendication 19 choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences à SEQ ID N°4 et 5, et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.
- 20
21. Oligonucléotide selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il consiste dans les séquences SEQ ID N° 4 et 5.
22. Sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries *Tropheryma whippelii* caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence selon la revendication 18 ou un oligonucléotide selon l'une des revendications 19 à 21.
- 25
23. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'une bactérie *Tropheryma whippelii* dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde la revendication 22, puis on détermine la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

24. Amorce nucléotidique utilisable pour la synthèse du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii* en présence d'une polymérase, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon les revendications 19 à 21, de préférence un oligonucléotide comprenant l'une des séquences SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5.

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Didier RAOULT, Bernard LA SCOLA, Attn: PCT Branch
Marie-Laure BIRG, Florence FENOLLAR

Application No. US National Stage of PCT/FR00/00754

Filed: September 20, 2001

Docket No.: 110530

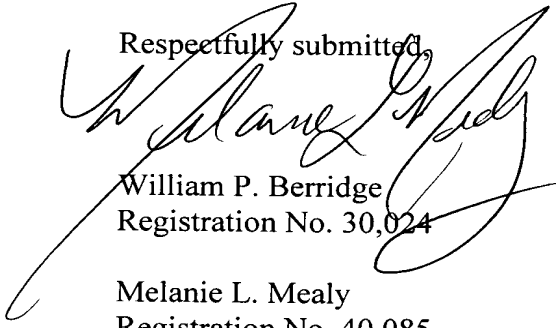
For: DIAGNOSIS OF WHIPPLE'S DISEASE

**TRANSLATION OF THE ANNEXES TO THE
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**Director of the U.S. Patent and Trademark Office
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached hereto is a translation of the annexes to the International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/409). The attached translated material replaces the claims.

Respectfully submitted,


William P. Berridge
Registration No. 30,024Melanie L. Mealy
Registration No. 40,085

WPB:MLM/zmc

Date: September 20, 2001

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400

DEPOSIT ACCOUNT USE AUTHORIZATION Please grant any extension necessary for entry; Charge any fee due to our Deposit Account No. 15-0461
--

CLAIMS

1. Bacterium *Tropheryma whippelii* responsible for Whipple's disease, isolated and established in culture.
2. Bacterium according to claim 1 obtained from a culture of human fibroblasts after at least 2 months of incubation in a culture medium based on MEM.
3. Bacterium according to claim 1 or 2, characterized in that it is deposited in the CNCM of the Institut Pasteur under the number I-2202.
4. Antigen of a bacterium according to one of claims 1 to 3.
5. Antigen according to claim 4, characterized in that it is a protein selected from those with molecular weights of about 10, 20, 35, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 170 and 200 kD determined by polyacrylamide gel electrophoresis using the SDS-PAGE technique and by Western blotting.
6. Specific antibody directed against the bacterium or an antigen of the bacterium according to one of claims 1 to 5.
7. Antibody according to claim 6, characterized in that it is a polyclonal antibody of animal origin, preferably a mouse immunoglobulin.
8. Antibody according to claim 6, characterized in that it is a monoclonal antibody.
9. Antibody according to claim 8, characterized in that it is a monoclonal antibody produced by a hybridoma deposited in the CNCM of the Institut Pasteur under the registration number I-2411.
10. Antigen according to claim 5, characterized in that it is a protein of 200 kD which reacts with an antibody according to claim 9.

11. Use of a bacterium according to any one of claims 1 to 3 or an antigen according to claim 4, 5 or 10 for the *in vitro* diagnosis of diseases associated with infections caused by the bacterium *Tropheryma whippelii*.
12. Use of an antibody according to one of claims 6 to 9 for *in vitro* diagnosis of the disease associated with infections caused by *Tropheryma whippelii* bacteria.
13. Method for the *in vitro* serological diagnosis of Whipple's disease, comprising the steps which consist essentially in detecting an immunological reaction between an antibody specific for the bacterium according to one of claims 6 to 9 and an antigen of said bacterium according to one of claims 4, 5 and 10.
14. Method for the *in vitro* serological diagnosis of Whipple's disease, comprising the step which consists essentially in detecting an immunological reaction between an antibody specific for a human immunoglobulin which recognizes said bacterium according to one of claims 1 to 3 and a said human immunoglobulin which recognizes said bacterium according to claims 1 to 5.
15. Method of serological diagnosis according to claim 14 comprising the following steps:
- depositing a solution containing the bacterium as defined in claims 1 to 3, in or on a solid support;
 - introducing the test serum or biological fluid into or onto said support;
 - introducing a solution of a labeled antibody specific for a human immunoglobulin which recognizes said bacterium, into or onto the support;
 - observing an incubation period;

- rinsing the solid support; and
- detecting said immunological reaction.

5

16. Kit for the *in vitro* detection of Whipple's disease by the method of one of claims 13 to 15, essentially comprising the following components:

10

- a solution containing the bacterium or an antigen as defined in claims 1 to 5 and 10; and/or

- a solution containing at least one antibody according to one of claims 6 to 9; and/or

15

- a solution containing at least one antibody specific for a human immunoglobulin which recognizes said bacterium according to claims 1 to 3.

17. Kit according to claim 16, characterized in that it comprises at least one labeled specific antibody.

20

18. Total or partial sequence of the *rpoB* gene of the bacterium according to one of claims 1 to 3.

25

19. Fragment of the *rpoB* gene according to claim 18, characterized in that it has the nucleotide sequence SEQ ID N° 3.

20. Oligonucleotide comprising a sequence specific for the *rpoB* gene of the bacterium *Tropheryma whippelii* according to one of claims 18 or 19.

30

21. Single-stranded oligonucleotide according to claim 20 selected from oligonucleotides having a sequence of at least 12 consecutive nucleotide units included in one of the sequences to SEQ ID N° 4 and 5, and from the oligonucleotides complementary to these oligonucleotides.



22. Oligonucleotide according to claim 20 or 21, characterized in that it consists of the sequences SEQ ID N° 4 and 5.
- 5 23. Probe for detecting *Tropheryma whippelii* bacteria in a biological sample, characterized in that it comprises an oligonucleotide according to one of claims 20 to 22.
- 10 24. Process for determining the presence or absence of a *Tropheryma whippelii* bacterium in a sample which contains or may contain nucleic acids of at least one such bacterium, characterized in that said sample is brought into contact with at least one probe ... claim 23 and the formation or absence of formation of a hybridization complex between said probe and the nucleic acid of the sample is then determined.
- 15 25. Nucleotide primer which can be used for synthesizing the *rpoB* gene of *Tropheryma whippelii* in the presence of a polymerase, characterized in that it comprises an oligonucleotide according to claims 20 to 22, preferably an oligonucleotide comprising one of the sequences SEQ ID N° 4 and SEQ ID N° 5.
- 20 26. Gene therapy probe, characterized in that it comprises an oligonucleotide as defined in claims 20 to 22.

.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 7 : C12N 1/00, C12R 1/01, C07K 16/12	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/58440
		(43) Date de publication internationale: 5 octobre 2000 (05.10.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00754

(22) Date de dépôt international: 24 mars 2000 (24.03.00)

(30) Données relatives à la priorité:

99/03989	26 mars 1999 (26.03.99)	FR
99/06679	21 mai 1999 (21.05.99)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (AIX-MARSEILLE II) [FR/FR]; Jardin du Pharo, 58, boulevard Charles Livon, F-13284 Marseille Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RAOULT, Didier [FR/FR]; 16, rue de Lorraine, F-13008 Marseille (FR). LA SCOLLA, Bernard [FR/FR]; Chemin de Saint Marc, 5, Lotissement Négrel, F-13790 Rousset (FR). BIRG, Marie-Laure [FR/FR]; La Grangette, Chemin des Oliviers, Les Amauds, F-13400 Marseille (FR). FENOLLAR, Florence [FR/FR]; Le Magellan, 352, avenue du Prado, F-13008 Marseille (FR).

(74) Mandataire: DOMANGE, Maxime; Cabinet Beau de Loménie, 232, avenue du Prado, F-13295 Marseille cedex 8 (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avec une indication relative à du matériel biologique déposé, fournie selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description.

(54) Title: DIAGNOSIS OF WHIPPLE DISEASE

(54) Titre: DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE WHIPPLE

(57) Abstract

The invention relates to a method for in vitro seriological diagnosis of Whipple disease, whereby the bacteria responsible for said disease is isolated and established in a culture and brought into contact with the serum of biological fluid of a patient. The invention also relates to useful oligonucleotides with a probe and a primer for amplification, sequencing and detection of the gene *rpoB* of bacteria *Tropheryma whippelii*.

(57) Abrégé

L'invention concerne une méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple, selon laquelle on met en contact la bactérie responsable de ladite maladie, isolée et établie en culture, avec le sérum ou le fluide biologique d'un patient. L'invention concerne également un dispositif pour la mise en oeuvre de cette méthode, ainsi qu'une trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie de Whipple. L'invention concerne également des oligonucléotides utiles avec sonde et amorce pour l'amplification, le séquençage et la détection du gène *rpoB* de la bactérie *Tropheryma whippelii*.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Diagnostic de la maladie de Whipple

La présente invention concerne le domaine du diagnostic. Plus précisément, l'invention concerne une méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple ainsi qu'un dispositif pour la mise en œuvre de cette méthode. L'invention
5 concerne également une trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie Whipple.

La présente invention concerne également le domaine des techniques de détection et/ou d'amplification et séquençage à l'aide de sondes ou d'amorces oligonucléotidiques, et leur application à la recherche de la présence ou à
10 l'identification des bactéries de l'espèce *Tropheryma whippelii*.

La maladie de Whipple est une maladie qui se présente sous des formes variées. La forme la plus classique est celle d'une fièvre avec une diarrhée chronique qui entraîne un amaigrissement, mais c'est aussi une maladie qui est susceptible de donner des atteintes articulaires chroniques, des atteintes cérébrales avec démence et
15 aussi une atteinte cardiaque en particulier une endocardite à hémoculture négative.

Dès sa description princeps en 1907, Whipple évoque l'existence d'une bactérie associée à la "lipodystrophie intestinale" devant l'observation de nombreux micro-organismes après coloration argentique d'un ganglion mésentérique (Whipple, Bull. John Hopkins Hosp. 1907 ; 18 : 328-391). La mise en évidence du caractère PAS (de
20 l'anglais "periodic acid Schiff") positif non spécifique de cette bactérie, puis les observations en microscopie électronique confirment la présence d'une espèce bactérienne intracellulaire de structure Gram positif (Cheers et al., Gastroenterology 1961 ; 41 : 129-138). L'outil moléculaire universel 16S ARNr a permis de confirmer cette hypothèse en précisant la taxonomie phylogénique de cette nouvelle espèce
25 bactérienne, et en lui assignant le nom provisoire de *Tropheryma whippelii* pour évoquer la notion de malabsorption intestinale et honorer le découvreur de l'affection (Relman et al., N. Engl. J. Med. 1992 ; 327 : 293-301). Le séquençage direct de 721 bases d'un fragment amplifié à partir d'une biopsie de l'intestin grêle d'un patient (Wilson et al., Lancet 1991 ; 338 : 474-475), puis à partir d'un ganglion d'un autre patient (Wilson et
30 al., ASM News 1992 ; 58 : 318-321) confirme l'originalité de l'espèce bactérienne associée à la maladie de Whipple. Le séquençage par Relman et al. (op. cité) de 1321 bases représentant 90 % du gène sur un échantillon, et un fragment de 284 bases chez quatre autres patients a permis de confirmer que l'espèce bactérienne associée à la maladie de Whipple représentait une espèce nouvelle, de préciser sa position

taxonomique dans le phylum des actinomycetes, c'est-à-dire des bactéries de structure Gram positif à haut contenu en guanosine plus cytosine, représentant un nouvel embranchement relativement proche de deux espèces connues en pathologie humaine, *Actinomyces pyogenes* et *Rothia dentocariosa*.

Le diagnostic de la maladie est actuellement fait par l'observation après coloration de frottis microscopique obtenu de biopsie ou par amplification et séquençage de l'outil du gène universel 16S ARNr (Relman et al., op. cité).

A ce jour en effet, la bactérie responsable de la maladie de Whipple n'a pas pu être isolée et cultivée de manière telle qu'une sérologie puisse être envisagée.

Contre toute attente, le Déposant a mis au point une méthode pour la culture de la bactérie responsable de la maladie de Whipple.

Les inventeurs ont découvert que la culture cellulaire qui permet l'isolement et la multiplication de la bactérie *Tropheryma whippelii* doit avoir à la fois une durée de vie longue et un temps de multiplication lent. Il ont en effet mis en évidence que le temps de dédoublement de la bactérie était très long (18 jours). De préférence, la primo-culture doit même être réalisée directement sur des cellules immortalisées.

Les travaux antérieurs réalisés sur des primo-cultures de monocytes de sang humain (SHOEDON et al. « Journal of Infectious Diseases » Volume 176, numéro 3, 1997 pages 672-677) n'ont pas permis de servir de base pour établir en culture la bactérie *Tropheryma whippelii* de façon à ce que celle-ci se multiplie, car la durée de vie moyenne de ces monocytes est de seulement 30 jours, ce qui est insuffisant compte tenu du temps de dédoublement de la bactérie.

En outre, si les cellules se multiplient trop vite, par rapport au temps de croissance de la bactérie, celles-ci ne peuvent pas être cultivées, car il se produit un effet de dilution et il devient impossible de ségréger les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées.

Dans un mode de réalisation avantageux, les inventeurs ont utilisé des cellules de fibroblastes immortalisées. Ces cellules de fibroblastes s'étalent sur le fond de la boîte de culture, arrêtent de se multiplier quand elles ont rempli tout le tapis cellulaire, mais peuvent être maintenues plusieurs mois en vie dans ces conditions.

Plus précisément, la méthode d'isolement et culture de la bactérie qui est détaillée dans les exemples 1 et 2 ci-après, comprend l'inoculation d'un broyat de valve cardiaque sur des fibroblastes humains de la lignée HEL dans du milieu MEM. La bactérie responsable de la maladie de Whipple a été isolée et établie en culture après

un minimum de deux mois d'incubation, le milieu de culture étant remplacé régulièrement. Par "établie en culture", on entend que la bactérie est obtenue de manière reproductible et se multiplie au cours du temps, notamment par repiquage successif sur culture de cellules.

5 La présente invention est donc relative à la bactérie ainsi isolée et établie en tant que source d'antigène. Cette bactérie a été déposée à la CNCM (Paris-France) sous le n° I-2202 et la référence d'identification TWIST- Marseille.

La présente invention a également pour objet un antigène de la bactérie selon l'invention. Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un antigène qui
10 est une protéine choisie parmi les protéines de poids moléculaire d'environ 10, 20, 35, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 170 et 200 kD déterminés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique SDS-PAGE et par Western Blot.

La présente invention a également pour objet un anticorps spécifique dressé contre la bactérie ou un antigène selon l'invention ; plus particulièrement un anticorps
15 polyclonal d'origine animale, notamment une immunoglobuline de souris ou de lapin, ou un anticorps monoclonal, notamment un anticorps monoclonal produit par l'hybridome déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le numéro d'enregistrement n° I-2411 et la référence d'identification TW 17G2.

La présente invention a également pour objet la détection d'un anticorps
20 spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie, de préférence IgG, IgM ou IgA, et plus particulièrement une immunoglobuline animale, notamment une immunoglobuline anti-humaine de chèvre.

La présente invention a encore plus particulièrement pour objet un antigène, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine de 200 kD réagissant avec un anticorps
25 monoclonal produit par les hybridomes selon l'invention ci-dessus mentionnés.

La présente invention est aussi relative à l'utilisation d'une bactérie, d'un antigène de la bactérie ou d'un anticorps spécifique selon l'invention, dans une méthode de diagnostic *in vitro* de maladies liées à des infections par la bactérie *Tropheryma whippelii*, ainsi qu'à une méthode pour le diagnostic sérologique de
30 l'infection à bactérie *Tropheryma whippelii* selon l'invention, qui comprend la mise en contact du sérum ou de tout autre liquide biologique d'un patient avec ladite bactérie et la détection d'une réaction immunologique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une méthode de diagnostic sérologique *in vitro* des infections à *Tropheryma whippelii*, dans laquelle on
35 met en contact la bactérie selon l'invention, un antigène de la bactérie selon l'invention

ou un anticorps spécifique selon l'invention, avec un échantillon provenant du patient consistant dans un sérum, un fluide biologique, ou un prélèvement humain.

La méthode selon l'invention comprend l'étape consistant essentiellement à détecter une réaction immunologique entre un anticorps spécifique de la bactérie
5 suivant l'invention et un antigène de ladite bactérie, ou entre un anticorps spécifique d'une immunoglobuline selon l'invention reconnaissant ladite bactérie et une dite immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie.

La présente invention est aussi relative à une méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple, qui comprend la mise en contact du
10 sérum ou de tout autre liquide biologique d'un patient avec la bactérie telle que définie ci-dessus, et la détection de la réaction immunologique.

Dans un mode de réalisation, la méthode de diagnostic selon l'invention comprend :

- le dépôt dans ou sur un support solide d'une solution de bactérie selon
15 l'invention, notamment de 0,5 à 5 µl, de préférence 1 µl de ladite solution contenant ladite bactérie ;
- l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à tester de préférence dilué;
- l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'un anticorps marqué,
20 notamment une immunoglobuline anti-humaine animale spécifique de l'immunoglobuline humaine, notamment de type IgG, IgM ou IgA, reconnaissant ladite bactérie ;
- l'observation d'une période d'incubation ;
- le rinçage éventuel du support solide et
25 - la détection proprement dite de la réaction immunologique entre notamment un anticorps humain reconnaissant ladite bactérie et ladite immunoglobuline anti-humaine.

Avantageusement, la méthode de diagnostic de l'invention met en oeuvre un dosage immunoenzymatique de type ELISA ou un dosage immunofluorescent. Plus
30 particulièrement, la méthode selon l'invention comprend :

- le dépôt dans ou sur un support solide d'une solution de bactérie isolée et établie comme indiqué ci-dessus ;
- l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à tester dilué ;

- l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'immunoglobuline anti-humaine marquée ;

- l'observation d'une période d'incubation ;

- le rinçage éventuel du support solide ;

5 - la détection proprement dite de la réaction immunologique.

Comme support solide, on peut utiliser tout dispositif adapté à la manipulation de suspensions cellulaires et bactériennes et notamment des tubes, des lames de verre, des tubes Bijoux ou des plaques rigides de microtitrage en polyéthylène, polystyrène, chlorure de polyvinyle ou nitrocellulose comportant des micropuits, les
10 lames de verre étant préférées.

L'anticorps détecté est une immunoglobuline, notamment de type G, M ou A, spécifique de la bactérie responsable de la maladie de Whipple. Comme type de marquage de l'immunoglobuline anti-humaine, on utilise un marquage enzymatique, radioactif ou fluorescent, ce dernier type de marquage étant préféré.

15 L'expression "marquage fluorescent" signifie que l'anticorps a été rendu fluorescent par un agent fluorescent approprié tel que l'iso(thio)cyanate de fluorescéine combinée à une immunoglobine animale reconnaissant l'anticorps humain.

L'expression "marquage radioactif" signifie que l'anticorps porte, soit sur un
20 élément de sa structure, par exemple les résidus de tyrosine constitutifs, soit sur un radical approprié qui lui a été fixé, un isotope radioactif permettant de le doser par comptage de la radioactivité qui lui est associée.

L'expression "marquage enzymatique" signifie que l'anticorps est couplé à une enzyme qui, associée à l'emploi de réactifs appropriés, permet une mesure
25 quantitative de cet anticorps spécifique.

Le substrat et les réactifs sont choisis de sorte que le produit final de la réaction ou de la séquence de réactions provoquée par l'enzyme et mettant en oeuvre ces substances soit :

- ou bien une substance colorée ou fluorescente qui diffuse dans le milieu
30 liquide environnant l'échantillon testé et qui fait l'objet, soit de la mesure finale spectrophotométrique ou fluorimétrique, respectivement, soit d'une évaluation à l'œil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées,

- ou bien une substance colorée insoluble qui se dépose sur l'échantillon testé et qui peut faire l'objet, soit d'une mesure photométrique par réflexion, soit d'une
35 évaluation à l'œil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées.

Lorsque l'on utilise un anticorps rendu fluorescent, la fluorescence associée à l'échantillon testé est lue directement sur un appareil approprié.

Lorsque l'on utilise une sonde radioactive, comme par exemple l'iode 125, la radioactivité associée à l'échantillon testé est comptée dans un compteur gamma selon toute modalité appropriée et par exemple après solubilisation des cellules par une solution alcaline (par exemple une solution de soude) et récupération de la solution contenant la radioactivité à l'aide d'un tampon absorbant.

Lorsque l'on utilise une enzyme sur l'anticorps spécifique, l'apparition d'un produit coloré ou fluorescent est obtenue en ajoutant une solution contenant le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs auxiliaires permettant d'obtenir finalement comme produit de réaction, soit un produit coloré soluble dans le milieu, soit un produit coloré insoluble, soit un produit fluorescent soluble, comme cela a été expliqué précédemment. On mesure ensuite le signal lumineux provenant des échantillons ainsi traités, à l'aide de l'appareillage adapté à chaque cas : photomètre en transmission, ou en réflexion ou fluorimètre respectivement. Alternativement, on peut aussi évaluer à l'oeil la coloration obtenue, en s'aidant éventuellement d'une gamme de solutions colorées étalonnées.

En utilisant comme enzyme la phosphatase alcaline, le couplage de cette enzyme avec l'anticorps spécifique est effectué selon la méthode proposée par Boehringer Mannheim-Biochemica. Les substrats préférentiels de cette enzyme sont le paranitrophénylphosphate pour une lecture finale spectrophotométrique ou le méthyl-4-umbelliféryl phosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5 chloro-4 indolyl-3 phosphate pour obtenir un produit de réaction coloré insoluble. On peut de même utiliser comme enzyme la β -galactosidase dont les substrats préférentiels sont l'orthonitrophényl β -D-galactopyranoside ou le méthyl-4 umbelliféryl β -D-galactopyranoside.

Préférentiellement, on peut coupler les anticorps spécifiques à la peroxydase. Dans ce cas, le procédé de couplage est dérivé de celui décrit par M.B. WILSON et P.K. NAKANE in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland. Amsterdam 1978, p. 215-224.

Les réactifs utilisés pour révéler la peroxydase conjuguée aux anticorps spécifiques contiennent de l'eau oxygénée, substrat de l'enzyme, et un chromogène approprié par exemple de l'orthophénylènediamine ou l'acide azino-2,2' bis(éthyl-3 thiazoline sulfonique-6) ou ABTS pour obtenir un produit final de réaction coloré et soluble dans le milieu ou bien la diamino-3,3' benzidine ou l'amino-3 éthyl-9 carbazole

ou le chloro-4 α -naphtol pour obtenir un produit final de réaction insoluble, ou bien l'acide parahydroxyphényl propionique pour obtenir un produit de réaction fluorescent soluble dans le milieu.

Un autre mode de réalisation de l'invention est l'utilisation d'anticorps
5 spécifiques couplés à l'acétylcholinestérase.

L'acétylcholinestérase est couplée à l'anticorps en utilisant préférentiellement un procédé dérivé de celui décrit dans le brevet français n° 2 550 799 ou un procédé qui comporte schématiquement la préparation de fragments de l'anticorps par une technique connue, la modification de l'enzyme par réaction avec un agent
10 hétérobifonctionnel approprié et enfin le couplage des produits ainsi obtenus. D'autres procédés connus de construction de conjugués immunoenzymatiques peuvent aussi être utilisés dans ce cas.

La révélation de l'activité enzymatique spécifiquement liée à l'antigène reconnu par le conjugué à l'acétylcholinestérase est réalisée de préférence selon la
15 technique bien connue qui emploie l'acétylthiocholine comme substrat de l'enzyme et le réactif d'Ellman, ou acide dithio-5,5' nitro-2 benzoïque comme chromogène, selon toute variante adaptée au cas examiné, par exemple celle décrite par Pradelles et al. dans Anal. Chem. 1985, 57 : 1170-1173.

Les chromogènes cités sont utilisés tels quels ou sous forme de sels solubles
20 dans l'eau.

La méthode de diagnostic sérologique de l'invention est adaptée à une utilisation dans des laboratoires de biologie et/ou d'anatomopathologie. Pour ce faire, on propose un dispositif pour la mise en oeuvre de cette méthode, qui comprend un support solide sur ou dans lequel on a déposé une solution contenant la bactérie telle
25 que définie précédemment.

L'invention est aussi relative selon un autre aspect à une trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie de Whipple. Cette trousse comprend comme composants :

- une solution contenant la bactérie ou un antigène selon l'invention, et/ou,
- 30 - une solution contenant au moins un anticorps selon l'invention et/ou,
- une solution contenant au moins un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite.

Plus particulièrement, la trousse comprend :

- une solution contenant la bactérie responsable de la maladie de Whipple,
35 isolée et établie comme décrit ci-dessus, à titre de témoin positif;

- une solution contenant un anticorps spécifique marqué;
- éventuellement, une solution de lavage.

L'anticorps spécifique utilisé dans la trousse de l'invention est
5 avantageusement marqué par une sonde radioactive, une enzyme ou un agent
fluorescent.

Lorsque l'anticorps spécifique est marqué par une enzyme, la trousse
comprend en outre le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs pour visualiser
l'activité de l'enzyme.

10 Lorsque l'anticorps spécifique est marqué par un agent fluorescent, on utilise
de préférence l'iso(thio)cyanate de fluorescéine.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on utilise comme anticorps
spécifique une immunoglobuline, en particulier une immunoglobuline de souris.

La présente invention a également pour objet le gène *rpoB* de la bactérie
Tropheryma whippelii selon la présente invention. La séquence du gène *rpoB* a été
15 déterminée par amplification enzymatique et séquençage automatique direct avec des
amorces consensus entre un grand nombre d'autres bactéries, de genres et
d'espèces différents.

Le gène *rpoB* code pour une des sous-unités de l'ARN polymérase
bactérienne et constitue un marqueur génétique permettant la détection spécifique de
20 la bactérie de l'espèce *Tropheryma whippelii*.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un fragment du gène
rpoB, caractérisé en ce qu'il présente la fréquence nucléotidique SEQ ID
n° 3 dans le listage des séquences en annexe.

La présente invention concerne donc également des séquences d'acides
25 nucléiques spécifiques de l'espèce *Tropheryma whippelii*, dont la séquence
nucléotidique est tirée du gène *rpoB* de ladite bactérie et notamment du fragment du
gène *rpoB* visé ci-dessus.

Selon Lazcano et al. [J. Mol. Evol. (1988) 27:365-376], les ARN polymérases
sont divisées en deux groupes selon leur origine, l'un constitué par les ARN
30 polymérases virales ARN- ou ADN-dépendantes, et l'autre constitué par les ARN
polymérases ADN-dépendantes d'origine eucaryote ou procaryote (archaeobactéries et
eubactéries). Les ARN polymérases ADN-dépendantes eubactériennes sont
caractérisées par une constitution multimérique simple et conservée notée « core
enzyme », représentée par $\alpha\beta\beta'$, ou « holoenzyme » représentée par $\alpha\beta\beta'\sigma$ [Yura and
35 Ishihama, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 : 59-97].

De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle fonctionnel, au sein du complexe enzymatique multimérique, de la sous-unité β de l'ARN polymérase eubactérienne. Les ARN polymérases archaebactérienne et eucaryote présentent, pour leur part, une structure plus complexe pouvant atteindre une dizaine, voire une trentaine de sous-unités [Pühler et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86 :4569-4573].

Les gènes qui codent pour les différentes sous-unités $\alpha\beta\beta'\sigma$ de l'ARN polymérase ADN-dépendante chez les eubactéries, respectivement les gènes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoD*, sont classés en différents groupes comprenant des gènes codant pour des protéines constitutives des sous-unités ribosomiques ou pour des enzymes impliquées dans la réplication et la réparation du génome [Yura and Yshihma, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 :59-97]. Certains auteurs ont montré que les séquences nucléiques des gènes *rpoB* et *rpoC* pouvaient être utilisées afin de construire des arbres phylogénétiques [Rowland et al., Biochem. Soc. Trans. (1992) 21:40s] permettant de séparer les différents embranchements et sous-embranchements parmi les règnes du vivant.

Avant d'exposer plus en détail cet aspect de l'invention, différents termes, utilisés dans la description et les revendications, sont définis ci-après :

- par « acide nucléique extrait de bactéries » on entend soit l'acide nucléique total, soit l'ADN génomique, soit les ARN messagers, soit encore l'ADN obtenu à partir de la transcription inverse des ARN messagers ;

- un « fragment nucléotidique » ou un « oligonucléotide » sont deux termes synonymes désignant un enchaînement de motifs nucléotidiques caractérisé par une séquence informationnelle des acides nucléiques naturels (ou éventuellement modifiés) et susceptibles de s'hybrider, comme les acides nucléiques naturels, avec un fragment nucléotidique complémentaire ou sensiblement complémentaire, dans des conditions prédéterminées de stringence stricte. L'enchaînement peut contenir des motifs nucléotidiques de structure différente de celle des acides nucléiques naturels. Un fragment nucléotidique (ou oligonucléotide) peut contenir par exemple jusqu'à 100 motifs nucléotidiques. Il contient généralement au moins 10, et en particulier au moins 12 motifs nucléotidiques et peut être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- un motif nucléotidique est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la

cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs précédents : à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine ou
5 toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide [PE Nielsen et al., Science, (1991) 254:1497-1500], soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple par remplacement par des esters choisis notamment parmi les diphosphates, les alkyl- et arylphosphonates et les phosphorothioates,

10 - par « séquence informationnelle », on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information analogue à celle donnée par la séquence des acides nucléiques naturels,

- par « hybridation », on entend le processus au cours duquel, dans des
15 conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de s'associer par des liaisons hydrogène stables et spécifiques, pour former un double brin. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la « stringence », c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée
20 à plus forte stringence. La stringence est fonction notamment de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction d'hybridation, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents
25 dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépend notamment des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent éventuellement être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine. En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction
30 d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65 °C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1M,

- une « sonde » est un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 12 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un
35 complexe d'hybridation avec un acide nucléique ayant, dans le cas présent, une

séquence nucléotidique comprise soit dans un ARN messager, soit dans un ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN messager, produit de transcription; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection) ou à des fins de thérapie,

5 - une « sonde de capture » est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption, ou par synthèse directe sur un solide. Des exemples de supports comprennent les plaques de microtitration et les puces à ADN,

10 - une « sonde de détection » peut être marquée au moyen d'un agent marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, les enzymes, en particulier les enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline), les composés chimiques chromophores, les composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, les analogues de bases nucléotidiques et les ligands tels que la biotine,

15 - une « sonde d'espèce » est une sonde permettant l'identification de l'espèce d'une bactérie,

 - une « sonde de genre » est une sonde permettant l'identification du genre d'une bactérie,

20 - une « amorce » est une sonde comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR, dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription, etc.

25 Un objet de la présente invention est un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5 dans le listage des séquences en annexe et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides. Ces oligonucléotides peuvent être des oligodésoxyribonucléotides (ADN) et des oligoribonucléotides (ARN) dans lesquels
30 « T » est remplacé par « U ».

 En particulier, un oligonucléotide selon la présente invention possède au moins 12 motifs tels que décrits ci-dessus et au plus 50 motifs. Plus particulièrement, un oligonucléotide selon la présente invention possède de 12 à 35 motifs.

35 Un oligonucléotide préféré a une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°4 et 5.

L'inosine est capable de s'apparier avec n'importe quelle autre base.

Les séquences SEQ ID N°4 et 5 peuvent être préparées par synthèse chimique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans l'article de Itakura K. et al. [(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323].

5 Une première application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries de l'espèce *Tropheryma whippelii* qui comprend une séquence nucléotidique d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5, et leurs séquences complémentaires. Dans la suite de la description, une
10 telle sonde de l'invention sera appelée sonde de l'espèce.

Les sondes selon l'invention peuvent être utilisées, à des fins de diagnostic, dans la recherche de la présence ou de l'absence d'un acide nucléique cible dans un échantillon, selon toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques de dépôt ponctuel sur filtre, dites « DOT-BLOT » [Maniatis et al. (1982)
15 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor], les techniques de transfert d'ADN dites « SOUTHERN BLOT » [Southern. E.M., J. Mol. Biol. (1975) 98:503], les techniques de transfert d'ARN dites « NORTHERN BLOT », ou les techniques dites « sandwich » [Dunn A.R., Hassel J.A. (1977) Cell 12:23]. On utilise en particulier la technique « sandwich », avec une sonde de capture et/ou une sonde de détection, lesdites
20 sondes étant capables de s'hybrider avec deux régions différentes de l'acide nucléique cible, et l'une au moins desdites sondes (généralement la sonde de détection) étant capable de s'hybrider avec une région de la cible qui est spécifique de l'espèce, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent avoir des séquences nucléotidiques au moins partiellement différentes.

25 L'acide nucléique à détecter (cible) peut être de l'ADN ou de l'ARN (l'un ou l'autre éventuellement obtenu après amplification par PCR). Dans le cas de la détection d'une cible de type acide nucléique double brin, il convient de procéder à la dénaturation de ce dernier avant la mise en œuvre du procédé de détection. L'acide nucléique cible peut être obtenu par extraction selon les méthodes connues des acides
30 nucléiques d'un échantillon à examiner. La dénaturation d'un acide nucléique double brin peut être effectuée par les méthodes connues de dénaturation chimique, physique ou enzymatique, et en particulier par chauffage à une température appropriée, supérieure à 80 °C.

Pour mettre en œuvre les techniques d'hybridation précitées, et en particulier les
35 techniques « sandwich », une sonde de l'invention, appelée sonde de capture, est

immobilisée sur un support solide, et une autre sonde de l'invention, appelée sonde de détection, est marquée avec un agent marqueur.

Les exemples de support et d'agent marqueur sont tels que définis précédemment.

5 Un autre objet de l'invention est un procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'une bactérie *Tropheryma whippelii*, dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, comprenant les étapes consistant à mettre en contact ledit échantillon avec au moins une sonde d'espèce de l'invention, puis à déterminer de façon connue en soi la
10 formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

Des exemples de détection de la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique comprennent les techniques décrites ci-dessus, à savoir les techniques "DOT-BLOT", "SOUTHERN-
15 BLOT" et "sandwich".

Selon une mise en œuvre particulière de ce procédé pour la détermination de la présence ou l'absence d'une espèce *Tropheryma whippelii*, on utilise plusieurs sondes d'espèce de l'invention, étant entendu que lesdites sondes sont capables de s'hybrider avec des régions non chevauchantes d'un acide nucléique correspondant au gène
20 *rpoB* de *Tropheryma whippelii*.

De manière avantageuse, une sonde d'espèce est immobilisée sur un support solide, et une autre sonde d'espèce est marquée avec un agent marqueur.

Une autre application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi
25 parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°4 et 5, qui est utilisable dans la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase par un procédé connu en soi, notamment dans des méthodes d'amplification utilisant une telle synthèse en présence d'une polymérase (PCR, RT-PCR, etc.). En particulier, une amorce de l'invention peut
30 être utilisée pour la transcription inverse spécifique d'une séquence d'ARN messenger de *Tropheryma whippelii* pour obtenir une séquence d'ADN complémentaire correspondante. Une telle transcription inverse peut constituer le premier stade de la technique RT-PCR, le stade suivant étant l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire obtenu. On peut également utiliser les amorces de l'invention pour

l'amplification spécifique par réaction de polymérisation en chaîne de la séquence totale de l'ADN du gène *rpoB* du *Tropheryma whippelii*.

Selon un cas particulier, ladite amorce comprenant un oligonucléotide de l'invention comprend en outre la séquence sens ou anti-sens d'un promoteur reconnu par une ARN polymérase (promoteurs T7, T3, SP6 par exemple [Studier FW, BA Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189:113] : de telles amorces sont utilisables dans des procédés d'amplification d'acide nucléique faisant intervenir une étape de transcription, tels que, par exemple, les techniques NASBA ou 3SR [Van Gemen B. et al. Abstract MA 1091, 7th International Conference on AIDS (1991) Florence, Italy].

Un autre objet de l'invention est une amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID n°4 à SEQ ID N°5 qui est utilisable pour le séquençage total ou partiel du gène *rpoB* d'une souche quelconque de *Tropheryma whippelii*. En particulier, l'amorce nucléotidique est utilisable pour le séquençage d'un acide nucléique amplifié. Le séquençage est l'obtention de la séquence totale ou partielle du gène *ropB* par un procédé connu en soi, polymérisation absortive utilisant des di-déoxynucléotides [Sanger F., Coulson A.R. (1975) J. Mol. Biol. 94:441] ou hybridations multiples utilisant les puces à ADN.

De préférence, dans une utilisation comme amorce ou pour le séquençage des gènes *rpoB*, on utilise les séquences SEQ.ID N° 4 et 5.

Enfin, un dernier objet de l'invention est une sonde de thérapie génique pour traiter les infections provoquées par une souche de *Tropheryma whippelii*, ladite sonde comprenant un oligonucléotide tel que défini précédemment. Cette sonde de thérapie génique, capable de s'hybrider sur l'ARN messager et/ou sur l'ADN génomique desdites bactéries, peut bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription et/ou de réplication.

Le principe des méthodes de thérapie génique est connu et repose notamment sur l'utilisation d'une sonde correspondant à un brin anti-sens : la formation d'un hybride entre la sonde et le brin sens est capable de perturber au moins l'une des étapes du décryptage de l'information génétique. Les sondes de thérapie génique sont donc utilisables comme médicaments antibactériens, permettant de lutter contre les infections causées par des spirochètes.

L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en exemples, qui concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention, et qui sont données à titre purement illustratif.

Les figures 1 à 4 sont des photographies de gel d'électrophorèse.

5 La figure 1 représente le profil protéique sur SDS-PAGE de *Tropheryma whippelii*.

La figure 2 représente le profil antigénique de *Tropheryma whippelii* obtenu par Western Blot.

Ligne 1 = sérum de souris immunisé.

10 Ligne 2 = sérum de lapin immunisé.

Ligne 3 = sérum de patient (IgG + IgM).

Ligne 4 = anticorps monoclonal 1.

Ligne 5 = anticorps monoclonal 2.

Ligne 6 = anticorps monoclonal 3.

15 Ligne 7 = anticorps monoclonal 4.

La figure 3 représente un Western Blot réalisé sur la souche TWIST N° I-2202 avec un sérum de patient atteint de la maladie de Whipple avec détection d'IgM.

20 La figure 4 représente la visualisation du produit d'amplification du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii* avec des amorces SEQ ID N°1 et 2 après coloration par le bromure d'ethidium.

Ligne 1 : *Tropheryma whippelii*

Ligne 2 : *Nocardia otitidiscaviarum*

Ligne 3 : *Mycobacterium tuberculosis*

25 Ligne 4 : *Staphylococcus epidermidis*

Ligne 5 : *Corynebacterium amycolatum*

Ligne 6 : *Mycobacterium avium*

Ligne 7 : *Escherichia coli*

Ligne 8 : H₂O

30 Ligne 9 : H₂O

Exemple 1 : Primoisolement de la bactérie

Le primoisolement a été réalisé par la technique de centrifugation sur tubes bijoux inoculés avec une lignée de fibroblastes humains HEL disponible auprès de l'ATCC. Les cellules HEL sont cultivées sur du milieu MEM (Gibco) additionné de 10 %
35 de sérum de veau foetal (Gibco) et de 2 mM de L-glutamine (Gibco). Les tubes bijoux

(Sterilin-Felthan-England, 3,7 ml) comportant une lamelle support de 12 mm de diamètre sont inoculés avec 1 ml de milieu de culture contenant environ 50 000 cellules et incubés à 37°C pendant 3 jours sous 5 % de CO₂ de façon à obtenir un tapis de cellules confluentes. La valve cardiaque étudiée a été broyée dans du milieu MEM, et la suspension a été utilisée pour inoculer les 3 tubes bijoux. Ces tubes ont ensuite été centrifugés à 700 g pendant 1 heure à 22°C. Le surnageant a ensuite été retiré, les tapis ont été lavés deux fois par du tampon PBS stérile, puis incubés avec 1 ml de milieu à 37°C sous 5 % de CO₂. Le suivi des cultures a été réalisé par cytocentrifugation de 100 µl du surnageant des tubes bijoux et coloration de Gimenez. Cette procédure a été répétée à 10, 20 et 30 jours. Au bout de 30 jours le surnageant et le tapis de cellules des tubes bijoux ont été récoltés et repiqués sur un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm² (boîte I) avec 15 ml de milieu de culture et incubées à 37°C sous 5 % de CO₂. Chaque semaine toutes les 6 semaines suivantes (J72), le tapis cellulaire a été examiné à l'aide d'un microscope inversé à la recherche d'un effet cytopathogène et le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais. Avant de changer le milieu, 200 µl de surnageant ont été utilisés pour réaliser une cytocentrifugation colorée par une coloration de Gimenez.

Aucun effet cytopathogène n'a été détecté avant le 65^{ème} jour. Au 72^{ème} jour, l'examen du tapis cellulaire en microscopie inverse a permis de détecter de petites inclusions sombres et irrégulières dans les cellules HEL. Sur la coloration de Gimenez de la cytocentrifugation du surnageant de la boîte I plusieurs bacilles fins ont été détectés, la plupart en localisation intracellulaire où ils apparaissent plus petits que les extracellulaires. Néanmoins, la plupart étaient mal ou non colorés par la coloration de Gimenez et apparaissaient bleu pâle. A la coloration de Gram de nombreux bacilles ont été aussi détectés. La plupart apparaissaient Gram positif mais plusieurs n'étaient que partiellement violet ou apparaissaient Gram négatif. A la coloration de Ziehl ces bacilles ne sont pas acido-alcool résistants. A la coloration par le PAS, les bacilles PAS positif apparaissaient plus nombreux que sur les colorations précédentes. La plupart des longs bacilles fins sont observables en localisation extracellulaire. Les cellules HEL apparaissent remplies de conglomerats PAS positif et de courts et fins bacilles PAS positif.

Exemple 2 : Propagation de l'isolat

Toute la procédure de propagation a été réalisée sur des cellules HEL cultivées sur du milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal et de 2 mM de L-glutamine et incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Au 75^{ème} jour 3 ml de

surnageant de la boîte I ont été utilisés pour inoculer 10 tubes bijoux par la méthode décrite précédemment et 2 ml de surnageant ont été utilisés pour inoculer un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm² (boîte A) avec 15 ml de milieu. Les cellules de la boîte I ainsi que le reste du surnageant ont été récoltés permettant
5 d'obtenir 10 ml de suspension. Cette suspension a ensuite été divisée en 5 aliquots de 2 ml. Un des aliquots a été congelé dans de l'azote liquide. Un aliquot a été inoculé sur un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm² (boîte B) avec 15 ml de milieu. Les cellules d'un aliquot ont été lysées par 4 cycles de congélation-décongélation utilisant de l'azote liquide et de l'eau chaude (55°C) puis inoculées sur
10 un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm² (boîte C) avec 15 ml de milieu. Un aliquot a été inoculé dans une boîte de culture sans tapis cellulaire de 25 cm² (boîte D) avec 15 ml de milieu. Au 85^{ème} jour, le milieu de toutes les boîtes et des tubes bijoux a été remplacé par du milieu frais. Les cellules ont été récoltées et inoculées dans une boîte de culture de 75 cm² (boîte D2) avec 30 ml de milieu. Avant
15 de changer le milieu, 200 µl de surnageant ont été utilisés pour réaliser une cyto centrifugation colorée par une coloration par le PAS et le reste du surnageant a été congelé en vue d'être utilisé comme antigène pour la sérologie. Au 95^{ème} et au 105^{ème} jours, le milieu de toutes les boîtes et des tubes bijoux a été changé comme décrit précédemment. Des petites portions de tapis cellulaire ont été grattées afin de
20 réaliser des frottis de cellules en vue d'une coloration par le PAS. L'efficacité de la propagation de la souche a été réalisée par une évaluation semi-quantitative. La présence de bacilles PAS positif a été évaluée microscopiquement en utilisant un grossissement X1000 de la façon suivante : 0, absence ; +, présents mais difficiles à trouver ; ++, faciles à trouver mais non présents dans tous les champs ; +++, présents
25 dans tous les champs. Ces évaluations ont été réalisées à l'aveugle.

Toutes les méthodes de propagation se sont avérées efficaces puisque toutes ont permis de retrouver l'isolat après 30 jours de sous-culture (Tableau 1). L'évaluation semi-quantitative a permis d'observer que les procédures les plus efficaces sont le repiquage en tube bijoux, la sous-culture de surnageant (boîte A), et le repiquage de
30 cellules (boîtes D, D2).

Tableau 1

		Tube bijoux	Boîte A	Boîte B	Boîte C	Boîte D	Boîte D2
Jour 10	Surnageant	+	-	+	-	+	NF
Jour 20	Surnageant	+	-	+	+	NF	-
	Frottis cellulaire	NF	+	+	+	NF	-
Jour 30	Surnageant	+++	+++	++	+	NF	++
	Frottis cellulaire	NF	++	+	+	NF	++

NF : non fait

Exemple 3 : Détection par immunofluorescence

La détection de bactéries intracellulaires a été réalisée au 105^{ème} jour directement dans un tube bijoux par immunofluorescence. Après fixation par l'acétone, le tube a été rincé deux fois au PBS. 100 µl du sérum du patient dilué au 1:50 avec du PBS avec 3 % de lait écrémé en poudre ont été ajoutés et le tube a été incubé en chambre humide à 37°C pendant 30 mn. Après 3 rinçages au PBS le tube a été incubé pendant 30 mn à 37°C avec 100 µl d'immunoglobuline de chèvre anti-humaine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Fluoline H, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) diluée au 1:200 avec du PBS additionné de 0,2 % de bleu d'Evans. Après 3 rinçages au PBS la lamelle a été montée (cellules vers le bas) en glycérine tamponnée (pH 8) et examinée avec un grossissement X400 à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss et d'un microscope confocal (LEICA DMIRBE) équipé d'un objectif X100 (NA. 1.4) à immersion.

L'examen en immunofluorescence montre que la coloration par le PAS ainsi que les autres colorations sous évaluent l'infection cellulaire. Sur la lamelle après 30 jours de sous-culture toutes les cellules sont remplies par l'antigène bactérien. L'étude en microscopie confocale confirme la localisation intracellulaire de la bactérie. Plusieurs bactéries sont détectées isolément sous formes de fins bacilles ressemblant à ceux observés par la coloration PAS. Néanmoins, la plupart du matériel immunopositif correspond à de plus grosses inclusions où il est impossible d'individualiser des bactéries. Il n'est pas détecté de matériel immunopositif dans le noyau des cellules.

Exemple 4 : Microscopie électronique

Au 105^{ème} jour, 300 µl d'une solution contenant les cellules récoltées dans la boîte D2 ont été préparés pour l'étude en microscopie électronique. Les cellules ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M

contenant 0,1 M de sucrose pendant 1 h à 4°C. Les cellules ont été rincées une nuit dans le même tampon puis fixées 1 h à température ambiante dans du tétraoxyde d'osmium en tampon cacodylate 0,1 M. La déshydratation a été réalisée par rinçages successifs dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes. Les cellules ont
5 ensuite été incluses en blocs d'Epon 812. De fines sections ont ensuite été coupées à partir des blocs à l'aide d'un microtome LKB Ultratome III puis colorées par une solution saturée d'acétate d'uranyle dans le méthanol et une solution aqueuse de citrate de plomb avant examen sur un microscope électronique Jeol JEM 1200 EX.

L'étude en microscopie électronique confirme que les inclusions PAS positif et
10 le matériel immunopositif correspondent à des bactéries intactes ou en voie de dégradation. La membrane cytoplasmique de ces bactéries est composée de deux couches denses aux électrons. La fine paroi bactérienne est parfois recouverte d'une pseudo-membrane externe qui donne un aspect trilamellaire. Des bactéries en cours de division sont observées.

15 **Exemple 5 : Production d'anticorps polyclonaux par la souris contre la bactérie responsable de la maladie Whipple**

Une souris de la souche Balb C a été injectée de façon intrapéritonéale avec 0,5 ml de surnageant contenant 10^4 bactéries responsables de la maladie de Whipple. La souris a été ensuite réinjectée 1, 2 et 3 semaines après avec 0,5 ml de la même
20 suspension. La souris a été saignée 1 semaine après cette dernière inoculation. Le sérum a été testé d'une part contre la bactérie responsable de la maladie de Whipple en culture et d'autre part sur la valve d'un patient atteint de la maladie de Whipple, une fois par immunofluorescence et une fois par immunoperoxydase. Les anticorps révélateurs étaient des anticorps anti-souris marqués à la fluorescéine ou marqués à
25 l'immunoperoxydase (fournis par la société Immunotech).

Les bactéries ont pu être visualisées à l'intérieur des cellules. La présente demande concerne donc aussi la détection directe de la bactérie responsable de la maladie de Whipple dans les biopsies et les différents prélèvements par exemple : valve cardiaque, biopsie digestive, ou biopsie de tout autre organe suspecté d'être
30 infecté par la bactérie responsable de la maladie de Whipple.

Exemple 6 : Production et utilisation des anticorps monoclonaux aux produits contre *Tropheryma whippelii* souche Twist-Marseille et détermination d'antigènes.

Matériel et Méthodes

Souche de *Tropheryma whippelii*. La souche de *Tropheryma whippelii* utilisée pour produire et screener les hybridomes et tester la spécificité des anticorps monoclonaux (Mabs) est la souche TWIST-Marseille déposée à la CNCM N° I-2202. *Tropheryma whippelii* a été cultivée sur fibroblastes humains embryonnaires (HEL) dans les conditions de culture préalablement décrites. Au 75^{ème} jour, les cellules infectées d'une flasque ont été prélevées centrifugées 10 minutes à 4.000 g. Le culot de centrifugation a ensuite été remis en suspension dans 5 ml de PBS. 0.5 ml de cette suspension a été inoculé à chaque souris. Les bactéries ont également été purifiées par gradient de rénograffine et remises en suspension dans de l'eau désionisée pour le SDS-PAGE ou du PBS pour la micro-immunofluorescence (MIF).

Production d'anticorps monoclonaux (Mabs). Des souris BALB/C femelles de six semaines ont été inoculées trois fois à 7 jours d'intervalle par injection intrapéritonéale de 0.5 ml de suspension de *Tropheryma whippelii* TWIST-Marseille N° I-2202 dans du PBS. Une semaine après la dernière des 3 injections, les souris ont reçu une dose de rappel en IV de 0.1 ml de *Tropheryma whippelii* en suspension dans du PBS. Trois jours plus tard, la rate des souris immunisées a été prélevée et les cellules spléniques ont été fusionnées avec des cellules myélomateuses SP2/O-Ag14 (10: 1) en utilisant du polyéthylène glycol à 50% (poids moléculaire : 1.300-1.600 ; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo). Les cellules fusionnées ont été cultivées dans un milieu de culture pour hybridome (Seromed. Berlin, Germany) supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL) et d'hypoxanthine aminopterin-thymidine (Sigma Chemical CO., St Louis, Mo). A 37°C dans une atmosphère humide enrichie de 5% en CO₂.

La présence d'anticorps anti-*T. whippelii* dans le surnageant a été détectée par MIF. Les hybridomes positifs ont été sous cultivés pour la production d'ascite. Les isotypes des Mabs ont été déterminés à l'aide du kit Immuno Type Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (SIGMA) contenant des antisérums de souris IgM IgA IgG1 IgG2a IgG2b et IgG3 (Sigma). La spécificité de Mabs a été testée par western blot. Une semaine après injection intrapéritonéale aux souris de 0.5 ml de pristane (2, 62 10, 14 – tétraméthylpentadécane ; Sigma), les anticorps en ascite ont été produits par injection intrapéritonéale de 3×10^6 hybridomes en suspension dans 0.5 ml de PBS.

Micro-Immunofluorescence (MIF). La MIF a été utilisée pour le screening des hybridomes et pour déterminer la spécificité des Mabs. Les antigènes constitués par des cultures de *Tropheryma whippelii* ont été déposés sur des lames à 24 puits à l'aide d'une plume. Après fixation au méthanol pendant 10 minutes à température

ambiante, les Mabs ont été déposés et incubés en chambre humide à 37°C pendant 30 minutes. Les lames ont ensuite été rincées deux fois 5 minutes en PBS, puis dans de l'eau distillée, séchées à l'air puis incubées pendant 30 minutes à 37°C à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgM et anti IgG de souris conjuguées à de la fluoresceine, dilués au 1/200 dans du PBS contenant 0.2% de bleu Evans (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Après rinçage, les lames ont été montées à l'aide de Fluorep (BioMérieux) puis été lues au grossissement x400 d'un microscope à fluorescence (Axioskop 20 ; Carl Zeiss, Gottinge, Germany). Les sérums des souris immunisées ont été utilisés comme contrôle positif et les sérums des souris saines comme contrôle négatif.

Pour détecter les anticorps anti- *Tropheryma whippelii* dans le sérum des patients atteints de maladie de Whipple, la MIF a été réalisée sur lames Labtech [Raoult D. et al. N. Engl. J. Med., 2000]. Les sérums ont été dilués au 1 :50, 1 :100, 1 :200, 1 :400 et 1 :800.

SDS-PAGE et Western blot. Le SDS-PAGE et le western blot ont été réalisés selon la méthode de Laemmli modifiée par l'utilisation de gel séparateur à 12% de polyacrylamide et de gel de transfert à 5%. Une suspension de *Tropheryma whippelii* contenant 4 mg de protéine/mL en tampon (0.0625 M Tris Hydrochloride [pH8.0], 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol 10% de glycérol, 0.02% de bleue de bromophénol) a été chauffée à 100°C pendant 5 minutes. Les antigènes dissous ont été séparés par électrophorèse en gel avec une intensité constante de 8 à 10 mA pendant 3 à 4 heures dans une cuve d'électrophorèse (Mini Protein II : Bio Rad, Richmond, Calif) (tampon de migration : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS). La taille des protéines a été déterminée par comparaison à un marqueur de poids peptidique (Low Rang : Bio Rad). Les antigènes ainsi séparés ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (pores de 0.45 µm) à l'aide d'un tampon de transfert (2.5mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol) sous un courant de 50 V pendant 1 heure à +4°C dans une cuve de Western Blot (Mini Trans-Blot ; Bio Rad). Après le transfert, les membranes de nitrocellulose ont été incubées toute la nuit avec une solution de 5% de lait écrémé pour bloquer les sites de fixation non spécifiques. Les membranes ont alors été lavées 3 fois en PBS puis séchées à l'air. Elles ont alors été incubées avec le surnageant des hybridomes dilués au 1 :4 ou le sérum des patients dilué au 1 :100 dans du PBS additionné de 3% de lait à température ambiante pendant 1 heure puis lavées comme décrit ci-dessus. Les membranes ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 1 heure avec un fragment F (ab')₂ d'anticorps de

chèvre anti-IgG de souris conjugué à de la peroxydase (Heavy and light chains : AffiniPure ; Jackson ImmunoResearch) dilué au 1 :500 dans du PBS additionné de 3% de lait écrémé. puis lavées dans du PBS. La présence d'anticorps spécifiques a été relevée par la présence d'une activité peroxydase grâce au substrat 4chloro-1-naphtol.

5 Tests en aveugle des Mabs. La spécificité des anticorps monoclonaux ont été évalués en aveugle sur 19 bactéries par MIF : 12 espèces de *Bartonella* : 5 *B. quintana*, *B. henselae* Marseille, *B. henselae* Houston, *B. Vinsonii* Baker, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. doshiae*, *B. taylorii*, *Coxiella burnetii* Nine Mile and 6 souches variées isolées dans notre laboratoire à partir d'échantillons cliniques, dont
10 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis*, *Mycobacterium avium*, *Corynebacterium* ANF group, *Actinomyces mayerii*. Après suspension dans du PBS et dépôt sur des lames à puits, la réactivité des Mabs avec les bactéries a été estimée par MIF comme décrit ci-dessus avec du liquide d'ascite dilué au 1 :100.

Patients. 15 patients ont été testés : 8 patients de maladie de Whipple à
15 localisation digestive uniquement, dont le diagnostic avait été fait par histologie et/ou amplification de *T. whippelii* par PCR dans des biopsies digestives ; 7 patients atteints d'endocardite à *T. whippelii* par PCR dans des biopsies valvulaires.

Souris et lapins. 5 souris et 1 lapin ont été inoculée avec une suspension de *T. whippelii* afin de déterminer quels seraient les antigènes reconnus par la réponse
20 anticorps.

Résultats.

Profils de SDS-PAGE (Fig 1). Le SDS-PAGE de *T. whippelii* a révélé plus particulièrement 7 bandes principales à : 10, 20, 80, 120, 150, 170, 200 kDA.

Production des Mabs. Le surnageant de 4 hybridomes a été testé par MIF.
25 Quatre hybridomes se sont révélés spécifiques de *T. Whippelii*. Un hybridome a été déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur 25 rue du Docteur Roux PARIS 75724 sous le n° I-2411 et la référence d'identification TW 17G2.

Tests sérologiques réalisés chez les patients. 13 des 15 patients testés (86.7%) ont présenté une sérologie positive, avec un taux d'IgM $\geq 1:100$. Le profil
30 antigénique observé en Western Blot a révélé une réactivité avec plusieurs bandes dont une bande majeure de 200 kDA en IgG (Figure #2). En IgM plusieurs profils protéiques sont repérés dont une réactivité contre des protéines de 100, 60, 50 et 35 kDA (figure #3).

Tests sérologiques réalisés chez les souris et lapin immunisés. Les souris et le
35 lapin immunisés ont présenté une sérologie positive, avec un taux d'IgM $> 1:100$. Le

profil antigénique observé en western blot a révélé une réactivité différente entre souris et lapin et différente de celle observée chez les patients. En revanche, une réactivité majeure a été observée avec une bande de 200 kDA.

Caractérisation des Mabs (Fig 2). Les 4 Mabs ont présenté une réactivité
5 spécifique pour un antigène de 200 kDA, déjà mis en évidence sur les western blot des patients, souris et lapin. Tous ont été identifiés comme des IgM. L'antigène reconnu a été détruit par action de la protéinase K, montrant qu'il s'agit d'une protéine.

Tests des Mabs en aveugle. L'ascite des 4 hybridomes n'a réagi qu'avec *T. whippellii*.

10 **Exemple 7 : Séquence du gène *rpoB* de *Tropheryma whippellii*.**

La séquence du gène *rpoB* de *Tropheryma whippellii* a été déterminée par amplification enzymatique et séquençage automatique direct utilisant des amorces consensus.

Les amorces consensus utilisées avaient pour séquence

15 SEQ ID n° 1 = 5'-TIA TGG GII CIA AIA TGC A-3'

SEQ ID n°2 = 5'-GCC CAI CAT TCC ATI TCI CC-3' (I = Inosine)

On a incorporé de l'ADN extrait de la souche *Tropheryma whippellii* Twist-Marseille CNCM I 2202 par lyse mécanique et chimique (Fast-Prep Bio 101) dans les conditions expérimentales suivantes : 35 cycles d'amplification, chaque cycle
20 comportant une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 sec., une hybridation initiale des amorces à 50°C pendant 30 sec. comportant un « ramping » descendant de 0,1°C par cycle, puis une élongation à 72°C pendant 60 sec.

Les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 ont été déterminées par l'alignement des séquences peptidiques déposées dans GenBank sous les numéros
25 d'accès suivants pour les bactéries suivantes : *Bacillus subtilis*, L43593, *Bartonella henselae*, AF171070, *Borrelia burgdorferi*, AE001144, *Buchnera aphidicola*, Z11913, *Chlamydia pneumoniae*, AE001593, *Chlamydia trachomatis*, AE001304, *Coxiella burnetti*, U86688, *Escherichia coli*, U76222, *Haemophilus influenzae*, U32733, *Helicobacter pylori*, E000625, *Legionella pneumophila*, AF087812, *Mycobacterium leprae*, Z14314, *Mycobacterium smegmatis*, U24494, *Mycobacterium tuberculosis*, L27989, *Mycoplasma gallisepticum*, L38402, *Mycoplasma genitalium*, U39715, *Mycoplasma pneumoniae*, AE000030, *Neisseria meningitidis*, Z54353, *Pseudomonas putida*, X15849, *Rickettsia prowazekii*, AF034531, *Rickettsia typhi*, P77941, *Salmonella enterica Typhimurium*, X04642, *Spiroplasma citri*, U25815, *Staphylococcus*

aureus, U970062, *Synechocystis spp.*, D90905, *Thermotoga maritima*, X72695, *Treponema pallidum*, AE001205 et *Human Granulocytic Ehrlichiosis agent*, AF237414.

Les séquences SEQ ID N° 1 et 2 ont été choisies en sélectionnant celles qui étaient les plus conservées, avec pour hypothèse qu'elles étaient aussi présentes
5 dans *Tropheryma whippelii*.

La séquence partielle du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii* (GenBank accessionnumber AF 243072) qui correspond à SEQ ID N° 3, obtenue à l'aide des amorces SEQ ID N° 1 et N° 2, est la suivante :

BASE 157 a 117 c 176 g 150 t 12 autres

10 1 AAGTCCCCNG GACGGNANAG GNATGGAGNG GTATGTANCG
ATCGATGCGG GTGATGTTTT.

61 AATTGCCNAG GATCCGGGCA TTGTGGGGGA TGTTTCCGCT
GATGTTGTCA CTGTCANNCA.

121 GGATGACGGG AAACATCGCG ACTACCATGT TGGTAAATTT
15 GTTCGTTCAA ATCAGGGCAA.

181 CTGTTACAAC CAGCNAGTTG TGGTCCGATC CGGAGATCGT
GTATAAAAAG GTACAGTTCT.

241 TGCACATGGT CCATGTACTG ACAAAGGTGA GCTTAGTCTT
GGTAGAAATC TTCTGGTTGC.

20 301 TTTCATGCC TGGGAGGGCT ATAACTTTGA GGATGCGATA
ATTATCAGCC AGAATTTGGT.

361 CAAGGACGAC ACCCTTTCNT CAATCCACAT AGAAGAACAT
GAGGTTAGCA CCCGGGATAC.

421 GAAGCTGGGC AGTGANAGAA ATAACGCGAG ACCTTCCGAA
25 TGTAAGCATG GATTACATAA.

481 AGGACTTGGA CGAACGGGGT ATTATCCGGA TTGGCGCTGA
GGTTGGCCCT GGGGACATTT.

541 TGGTTGGTAA GGTGACCCCA AAGGGCGAAG ACCGAACTCA
ACGCGGAAGA ACGTTTGCTG.

30 601 AGGGCTATCT TT.

Exemple 8 : Détection spécifique du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii*.

Des séquences spécifiques à *Tropheryma whippelii* suivantes sont été sélectionnées dans le fragment SEQ ID N° 3 :

SEQ ID N° 4 : 5'-GCA TTG TGG GGG ATG TTT-3'

35 SEQ ID N° 5 : 5'-TTG GGG TCA CCT TAC CAA-3'

Elles ont été choisies comme étant spécifiques à *Tropheryma whippelii* par comparaison avec les séquences connues du gène *rpoB* des 28 bactéries répertoriées dans Gen Bank mentionnées ci-dessus.

Exemple 9 : Amplification spécifique du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii*.

Le gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii* a été amplifié par la technique PCR utilisant 35 cycles d'amplification comportant chacun une phase de dénaturation de 94°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation des amorces SEQ ID N° 4 et 5 à 52°C pendant 30 secondes et une phase d'élongation à 72°C pendant 90 secondes. Le produit d'amplification est visualisé après coloration par le bromure d'ethidium (figure 4).

Les bactéries contrôles, à savoir *Mycobacterium avium*, *Micobacterium Tuberculosis*, *Nocardia Otitidiscaviarum*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Eperdimilis*, *Corynebacterium Amycolatum*, n'ont pas été détectées, démontrant la spécificité des amorces testées.

Les séquences *rpoB* de ces espèces contrôles déposées dans GenBank sous les numéros d'accès suivants : *Mycobacterium avium* ATCC 25291, AF060336 ; *Mycobacterium tuberculosis* U12205, *Escherichia coli* K-12, U77436 ont été choisies du fait de leur proximité génétique avec *Tropheryma whippelii* ou du fait de leur occurrence comme contaminant possible des prélèvements cliniques soumis pour détection de *Tropheryma whippelii*.

REVENDICATIONS

1. Bactérie *Tropheryma whippelii* responsable de la maladie de Whipple isolée et établie en culture.
2. Bactérie selon la revendication 1, obtenue à partir d'une culture de cellules de fibroblaste humain après au moins 2 mois d'incubation, dans un milieu de culture à base de MEM.
3. Bactérie selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est déposée à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2202.
4. Antigène d'une bactérie selon l'une des revendications 1 à 3.
5. Antigène selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine choisie parmi les protéines de poids moléculaire d'environ 10, 20, 35, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 170 et 200 kD déterminés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique SDS-PAGE et par Western Blot.
6. Anticorps spécifique dressé contre la bactérie ou un antigène de la bactérie selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Anticorps suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal d'origine animale, de préférence une immuno globuline de souris.
8. Anticorps selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal.
9. Anticorps selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal produit par un hybridome déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le numéro d'enregistrement I-2411.
10. Antigène selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine de 200 kD réagissant avec un anticorps selon la revendication 9.
11. Utilisation d'une bactérie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un antigène suivant les revendications 4, 5 ou 10 pour le diagnostic in vitro de maladies liées à des infections par la bactérie *Tropheryma whippelii*.

12. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 6 à 9, pour le diagnostic in vitro de la maladie liée à des infections par des bactéries *Tropheryma whippelii*.
- 5 13. Méthode pour le diagnostic sérologique in vitro de la maladie de Whipple qui comprend les étapes consistant essentiellement à détecter une réaction immunologique entre un anticorps spécifique de la bactérie suivant l'une des revendications 6 à 9, et un antigène de ladite bactérie selon l'une des revendications 4, 5 et 10.
- 10 14. Méthode pour le diagnostic sérologique in vitro selon la maladie de Whipple qui comprend l'étape consistant essentiellement à détecter une réaction immunologique entre un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon l'une des revendications 1 à 3, et une dite immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon les revendications 1 à 5.
- 15 15. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 14, qui comprend les étapes suivantes :
- le dépôt dans ou sur un support solide de solution contenant la bactérie telle qu'elle est définie dans les revendications 1 à 3,
 - l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à tester,
 - l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'un anticorps marqué
20 spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie,
 - l'observation d'une période d'incubation,
 - le rinçage du support solide, et
 - la détection de ladite réaction immunologique.
- 25 16. Trousse pour la détection in vitro de la maladie de Whipple selon la méthode d'une des revendications 13 à 15 comprenant essentiellement comme composants :
- une solution contenant la bactérie ou un antigène tels que définis dans les revendications 1 à 5 et 10, et/ou,

- une solution contenant au moins un anticorps selon l'une des revendications 6 à 9 et/ou,

- une solution contenant au moins un anticorps spécifique d'une immunoglobuline humaine reconnaissant ladite bactérie selon les revendications 1 à 3.

17. Trousse suivant la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps spécifique marqué.

18. Séquence totale ou partielle du gène *rpoB* de la bactérie selon l'une des revendications 1 à 3.

19. Fragment du gène *rpoB* selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il présente la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.

20. Oligonucléotide comprenant une séquence spécifique du gène *rpoB* de la bactérie *Tropheryma whippelii* selon l'une des revendications 18 ou 19.

21. Oligonucléotide monocaténaire selon la revendication 20 choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences à SEQ ID N°4 et 5, et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.

22. Oligonucléotide selon la revendication 20 ou 21, caractérisé en ce qu'il consiste dans les séquences SEQ ID N° 4 et 5.

23. Sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries *Tropheryma whippelii* caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon l'une des revendications 20 à 22.

24. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'une bactérie *Tropheryma whippelii* dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde la revendication 23, puis on détermine la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

5

25. Amorce nucléotidique utilisable pour la synthèse du gène *rpoB* de *Tropheryma whippelii* en présence d'une polymérase, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon les revendications 20 à 22, de préférence un oligonucléotide comprenant l'une des séquences SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5.
26. Sonde de thérapie génique, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide tel que défini à les revendications 20 à 22.

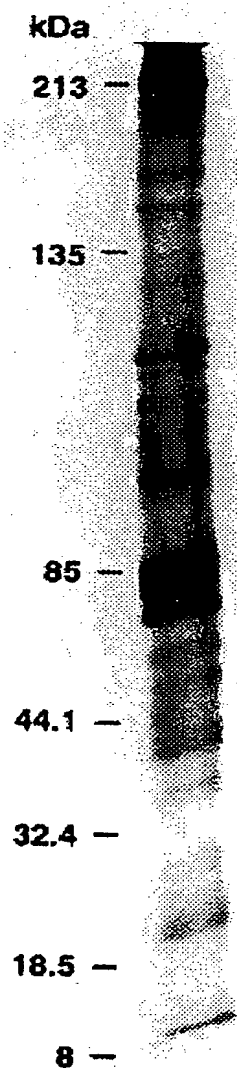
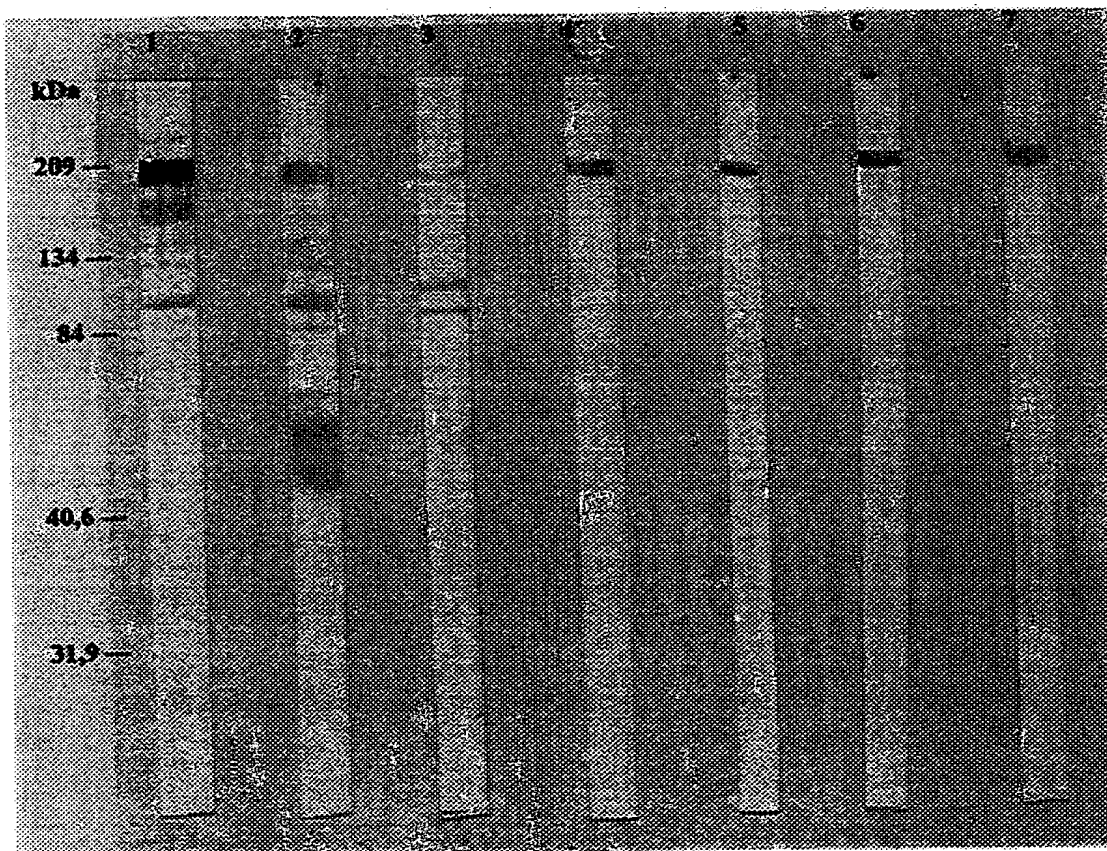


FIG.1

**FIG.2**

3/4

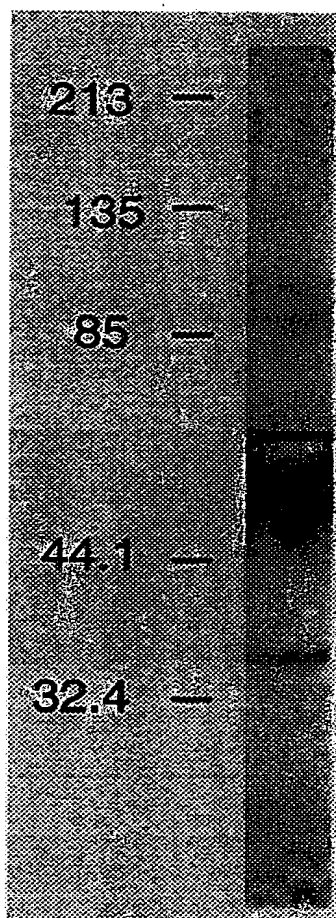


FIG.3

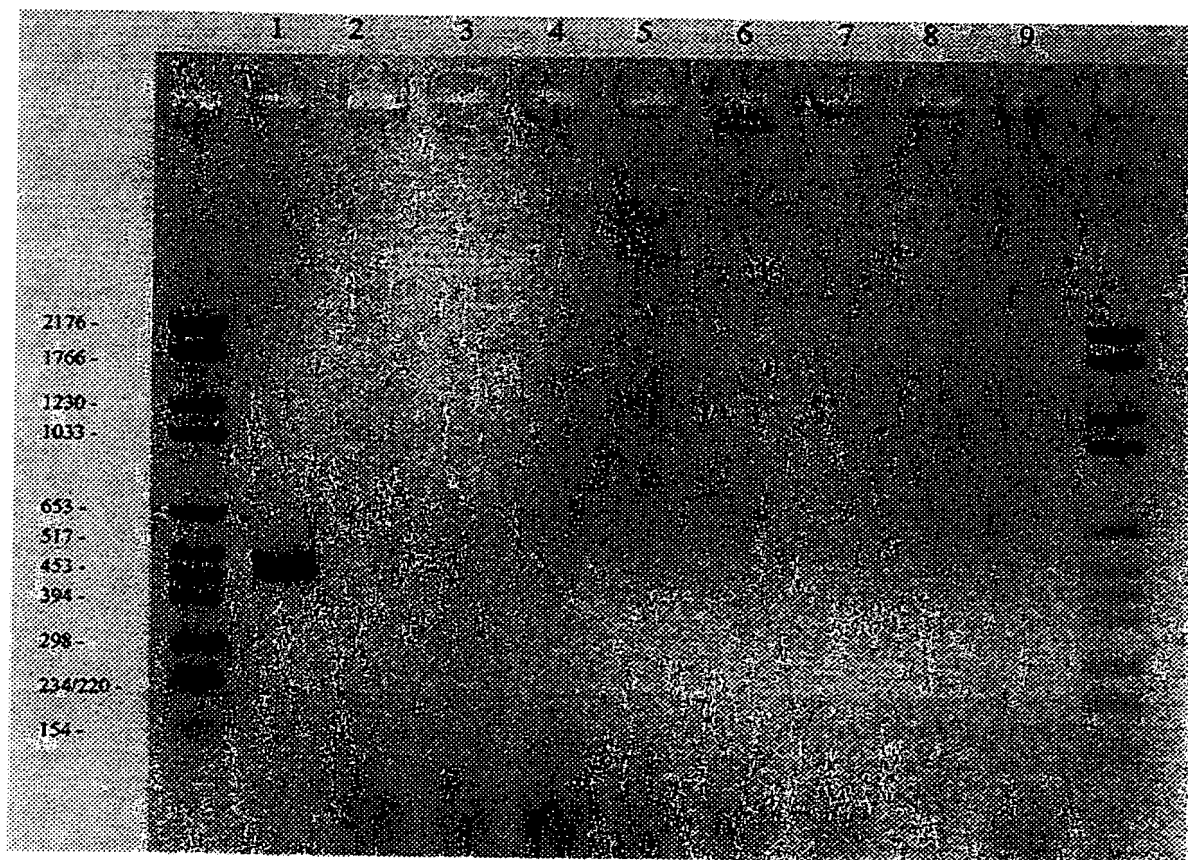


FIG.4

LISTE DE SEQUENCES

<110> Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)

<120> Diagnostic de la maladie de Whipple

<130> H52437-2

<140>

<141>

<150> FR 99 03989

<151> 1999-03-26

<150> FR 99 06679

<151> 1999-05-21

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucléotide

<400> 1

tntatggggnnc naanatgca

19

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucléotide

<400> 2

gcccancatt ccatntcncc

21

<210> 3

<211> 612

<212> ADN

<213> Tropheryma whippelii

<400> 3
aagtcctcng gacgganag gnatggagng gtatgtancg atcgatgcgg gtgatgtttt
60
aattgccnag gatccgggca ttgtggggga tgtttccgct gatgttgtca ctgtcannca
120
ggatgacggg aaacatcgcg actaccatgt tggtaaattt gttcgttcaa atcagggcaa
180
ctgttacaac cagcnagttg tggtcgcgac cggagatcgt gtataaaaag gtacagttct
240
tgcacatggt ccatgtactg acaaagggtga gcttagtctt ggtagaaatc ttctgggtgc
300
tttcatgccc tgggagggtc ataactttga ggatgcgata attatcagcc agaatttggt
360
caaggacgac accctttcnt caatccacat agaagaacat gaggttagca cccgggatac
420
gaagctgggc agtganagaa ataacgcgag accttccgaa tgtaagcatg gattacataa
480
aggacttga cgaacggggt attatccgga ttggcgctga ggttggccct ggggacattt
540
tggttggtaa ggtgaccca aagggcgaag accgaactca acgcggaaga acgtttgctg
600
agggctatct tt
612

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucléotide

<400> 4
gcattgtggg ggatgttt
18

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucléotide

<400> 5
ttggggtcac cttaccaa
18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/00 C12R1/01 C07K16/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RELMAN D.A. ET AL.: "Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 327, 1992, pages 293-301, XP002123741 cited in the application	1
X	DRANCOURT M.: "Tropheryma Whippelii, pathogene emergent a culture intracelulaire responsable de la maladie de Whipple" PRESSE MEDICALE, vol. 28, no. 8, 27 February 1999 (1999-02-27), pages 435-439, XP002123742 the whole document	1

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2000

Date of mailing of the international search report

21/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00754

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHOEDON G. ET AL.: "Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of Tropheryma whippelii" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 176, no. 3, 1997, pages 672-677, XP002123743 cited in the application abstract	1,2
X	--- ZAAIJER H.L. ET AL.: "De ziekte van Whipple" NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 143, no. 8, 20 February 1999 (1999-02-20), pages 388-392, XP002123744 abstract	1
X,P	--- MULLER C. ET AL.: "Cultivation of T. Whippelii from peripheral blood mononuclear cells" GASTROENTEROLOGY, vol. 116, no. 4 part 2, - April 1999 (1999-04) page A910 XP002123745 abstract	1
X,P	--- RAOULT D. ET AL.: "Cultivation of the bacillus of Whipple's disease" THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 342, no. 9, 2 March 2000 (2000-03-02), pages 620-625, XP000913986 cited in the application the whole document	1-26
A,P	--- KIM B-J ET AL.: "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB)" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 1714-1720, XP000913990	21-26
A,P	--- HINRIKSON H.P.: "Detection of three different types of 'Tropheryma whippelii' directly from clinical specimens by sequencing single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and type specific PCR of their 16S-23S rbosomal intergenic spacer region" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 49, October 1999 (1999-10), pages 1701-1706, XP000914233 --- -/--	21-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00754

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MOLLET C. ET AL.: "rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 26, no. 5, 1997, pages 1005-1011, XP000913977 abstract paragraphs '0004!-'0006! figure 1</p> <p>----</p>	21-26
Y	<p>VON HERBAY A. ET AL.: "DIAGNOSTIC APPLICATION OF A POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR THE WHIPPLE'S DISEASE BACTERIUM TO INTESTINAL BIOPSIES"</p> <p>GASTROENTEROLOGY, vol. 110, 1996, pages 1735-1743, XP000913982 the whole document</p> <p>-----</p>	21-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00754

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N1/00 C12R1/01 C07K16/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	RELMAN D.A. ET AL.: "Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 327, 1992, pages 293-301, XP002123741 cité dans la demande	1
X	--- DRANCOURT M.: "Tropheryma Whippelii, pathogene emergent a culture intracelulaire responsable de la maladie de Whipple" PRESSE MEDICALE, vol. 28, no. 8, 27 février 1999 (1999-02-27), pages 435-439, XP002123742 le document en entier --- -/-	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SCHOEDON G. ET AL.: "Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of Tropheryma whippelii" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 176, no. 3, 1997, pages 672-677, XP002123743 cité dans la demande abrégé</p>	1,2
X	<p>ZAAIJER H.L. ET AL.: "De ziekte van Whipple" NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 143, no. 8, 20 février 1999 (1999-02-20), pages 388-392, XP002123744 abrégé</p>	1
X,P	<p>MULLER C. ET AL.: "Cultivation of T. Whippelii from peripheral blood mononuclear cells" GASTROENTEROLOGY, vol. 116, no. 4 part 2, - avril 1999 (1999-04) page A910 XP002123745 abrégé</p>	1
X,P	<p>RAOULT D. ET AL.: "Cultivation of the bacillus of Whipple's disease" THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 342, no. 9, 2 mars 2000 (2000-03-02), pages 620-625, XP000913986 cité dans la demande le document en entier</p>	1-26
A,P	<p>KIM B-J ET AL.: "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB)" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 6, juin 1999 (1999-06), pages 1714-1720, XP000913990</p>	21-26
A,P	<p>HINRIKSON H.P.: "Detection of three different types of 'Tropheryma Whippelii' directly from clinical specimens by sequencing single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and type specific PCR of their 16S-23S rbosomal intergenic spacer region" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 49, octobre 1999 (1999-10), pages 1701-1706, XP000914233</p>	21-26
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00754

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-----------	--	-------------------------------

Y

MOLLET C. ET AL.: "rpoB sequence analysis
as a novel basis for bacterial
identification"
MOLECULAR MICROBIOLOGY,
vol. 26, no. 5, 1997, pages 1005-1011,
XP000913977
abrégé
alinéas '0004!-'0006!
figure 1

21-26

Y

VON HERBAY A. ET AL.: "DIAGNOSTIC
APPLICATION OF A POLYMERASE CHAIN REACTION
ASSAY FOR THE WHIPPLE'S DISEASE BACTERIUM
TO INTESTINAL BIOPSIES"
GASTROENTEROLOGY,
vol. 110, 1996, pages 1735-1743,
XP000913982
le document en entier

21-26



.

,

.

.